

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(43) 国际公布日:

2004年12月2日(02.12.2004)

(10) 国际公布号:

WO 2004/104204 A1

(51) 国际分类号⁷: C12N 15/86, 15/12, A61K 48/00, A61P 17/00

(21) 国际申请号: PCT/CN2004/000458

(22) 国际申请日: 2004年5月9日(09.05.2004)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
03125129.3 2003年5月10日(10.05.2003) CN

(71)(72) 发明人/申请人: 彭朝晖(PENG, Zhaohui) [CN/CN]; 张晓志(ZHANG, Xiaozhi) [CN/CN]; 中国广东省深圳市高新技术产业园(北区) 郎山路赛百诺公司, Guangdong 518057 (CN).

(74) 代理人: 北京纪凯知识产权代理有限公司(JEEKAI & PARTNERS); 中国北京市宣武门西大街甲129号金隅大厦601室, Beijing 100031 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护):
AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW,

BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN,
MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL,
PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA,
ZM, ZW

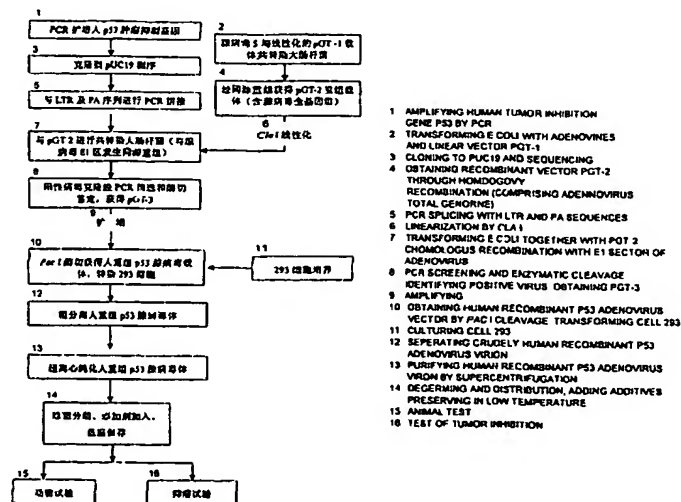
(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护):
ARIPO(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD,
SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚专利(AM, AZ, BY,
KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲专利(AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU,
IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG)

本国际公布：
— 包括国际检索报告。

所引用双字母代码和其它缩写符号, 请参考刊登在每期 PCT 公报期刊起始的“代码及缩写符号简要说明”。

(54) Title: RECOMBINANT GENE MEDICINE OF ADENOVIRUS VECTOR AND GENE p53 FOR TREATING PROLIFERATIVE DISEASES

(54) 发明名称: 治疗增生性疾病的腺病毒载体与p53基因的基因重组药物



(S7) Abstract: A kind of recombinant gene medicine of adenovirus vector and gene p53 which can treat proliferative diseases is a confusion sequence constructed from adenovirus vector and human tumor inhibition gene p531 s expression kit. In the present invention, we made homologous recombination of adenovirus vector with human gene p53 in procaryotic cells (E. coli), then obtained the recombinant gene medicine of adenovirus vector and human gene p53 expression kit. The human p53 gene expression kit is a characteristic sequence consisting of promotor-p53cDNA-polyadenine nucleotide. The medicine can be used to prepare clinic gene therapeutic products for treating proliferative diseases such as

〔见续页〕

WO 2004/104204 A1



(57) 摘要

一种治疗增生性疾病的腺病毒载体与 p53 基因的基因重组药物，该基因重组药物是由腺病毒载体与 p53 人肿瘤抑制基因表达盒构建而成的融合序列。本发明将腺病毒载体与人 p53 基因在原核细胞 (E. coli) 中同源重组，获得腺病毒载体与人 p53 基因表达盒构建的基因重组药物。其人 p53 基因表达盒是由启动子—p53cDNA—多聚腺嘌呤核苷酸构成的特征序列。使用本发明的基因重组药物，可制备成临床级基因治疗制品，用于治疗如瘢痕疙瘩等增生性疾病。

治疗增生性疾病的腺病毒载体与 p53 基因的基因重组药物

技术领域

本发明涉及基因工程技术，更具体地说是涉及一种由人类肿瘤抑制基因 p53 与腺病毒载体重组序列构建成的用于治疗增生性疾病的基因重组药物。

背景技术

增生性疾病是以细胞增生和/或代谢产物异常表达为特征的一种基因病，是广泛发生于人体各组织器官(如皮肤、骨髓、乳腺等)并产生不同程度功能障碍的一种良性增生。瘢痕是人类创伤修复过程中必然的产物和最终结果，任何创伤的愈合都会由不同程度的瘢痕形成。瘢痕分为正常瘢痕和病理性瘢痕。病理性瘢痕包括增生性瘢痕和瘢痕疙瘩，均表现为瘤样增生及功能障碍，是人类医学四大难题之一。瘢痕疙瘩是一种皮肤增生性疾病，指人体某处皮肤损伤后引发或自发产生的胶原异常积聚所致的过度瘢痕化。它们临床表现为过度生长，超过原伤口界限，侵犯临近组织，自始至终不退化且单纯手术切除后易复发等特点。有众多的实验证实，瘢痕疙瘩存在 p53 基因的突变，目前仍然缺乏治疗瘢痕疙瘩的明确且有效的方案，它是整形外科面临的一个最重要的难题之一。

作为可用于基因治疗的各种载体，本身不具有任何治疗疾病的意义、无临床应用价值；而作为可用于各种治疗目的基因，由于导入靶细胞及在靶细胞内表达的难度，只具有潜在的治疗作用，而不具备实用的临床价值。只有将具有潜在治疗作用的基因与可转移基因的载体结合，通过后者介导，将目的基因导入靶细胞并表达，才能达到真正的临床治疗效果。因此，构建治疗基因与基因载体的融合序列是实现基因治疗的关键。

将目的基因的表达盒与载体进行融合常用的方法是在真核细胞中进行

同源重组，过程复杂，费时费力。而使用在原核细胞（大肠杆菌）中实现同源重组、构建融合表达载体的新技术则可有效解决上述问题。

缺乏特异性、靶向性及高效性的基因转移载体一直是肿瘤基因治疗的一个难题。目前，用于基因治疗研究的载体主要分为病毒载体和非病毒载体两大类。常用的病毒载体有腺病毒载体、腺相关病毒载体和逆转录病毒载体等。腺病毒载体是常用的基因载体，它的优点在于转染效率高、可操作性好、能携带较大的目的基因片断、可制备高效价的病毒颗粒，易于工业化生产，既能感染分裂期细胞也可感染非分裂期细胞，具有安全、致病性低等优点。但也存在不足之处，一是感染缺乏特异性，二是具有免疫原性。因此，对腺病毒载体进行存利去弊的改进是发展基因治疗的必由之路。研究表明，腺病毒载体 E1 或 E3 缺失区携带外源性基因时，可以实现目的基因的较长时间的表达，且可降低其免疫原性；逆转录病毒载体能携带外源性基因整合进靶细胞基因组中实现目的基因稳定持久的表达，但逆转录病毒体外繁殖滴度低、转染效率低，只感染分裂期细胞。对染色体的随机整合，有致癌的危险性；其他可用于基因转移的病毒载体和非病毒载体均存在不同的利弊。

发明内容

本发明旨在将具有潜在治疗作用的基因与可转移基因的载体进行有机结合，而提供一种治疗增生性疾病的腺病毒载体与 p53 基因的基因重组药物，以诱导增生性疾病异常增生细胞表达功能正常的 P53 蛋白，从而有效抑制异常细胞的增殖，达到治疗如瘢痕疙瘩等增生性疾病的目的是。

本发明的目的还在于提供该基因重组药物的制备方法，使其能获得实际应用。

为实现上述目的，本发明提供一种治疗增生性疾病的腺病毒载体与 p53 基因的基因重组药物，其特征在于，该基因重组药物是由腺病毒载体与 p53 人肿瘤抑制基因表达盒构建而成，其融合序列为：

腺病毒 5 基因组序列右侧-ATGTTTACCGCCACACTCGCAGGGTCTGCACCTGGTGCGGG

TCTCATCGTACCTCAGCACCTTCCAGATC₇₀TCTGACATGCGATGTCGACTCGACTGCTTCGCGA
TGTAACGGGCCAGATATACGCGTATCTGAGGGGACTAGGGTGTGTTTAGGCGAAAAGCGGGGCTT
CGGTTGTACGCGGTTAGGAGTCCCCTCAGGATATAGTAGTTTCGCTTTTGCATAGGGAGGGGGA
AATGTAGTCTTATGCAATACTCTTGTAGTCTTGCAACATGGTAACGATGAGTTAGCAACATGCC
TTACAAGGAGAGAAAAAGCACCGTGTCATGCCGATTGGTGGAAGTAAGGTGGTACGATCGTGCCT
TATTAGGAAGGCAACAGACGGGTCTGACATGGATTGGACGAACCACTGAATTCCGCATTGCAGA
GATATTGTATTTAAGTGCCTAGCTCGATACAATAAACGCCATTTGACCATTACCCACATTGGTG
TGCACCTCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCCC₅₂₃CTAGAGCCACCGTCCAGGGAGCAGGTAG
CTGCTGGGCTCCGGGGACACTTTGCGTTCCGGGCTGGGAGCGTCTTTCCACGACGGTGACACGCT
TCCCTGGATTGGCAGCCAGACTGCTTTCCGGGTCACTGCC₆₅₅ATGGAGGAGCCGCAGTCAGATCC
TAGCGTCGAGCCCCCTCTGAGTCAGGAAACATTTTCAGACCTATGGAACTACTTCCTGAAAAC
AACGTTCTGTCCCCCTTGCCGTCCCAAGCAATGGATGATTTGATGCTGTCCCCGGACGATATTG
AACAATGGTTCACTGAAGACCCAGGTCCAGATGAAGCTCCCAGAATGCCAGAGGCTGCTCCCC
CGTGGCCCCCTGCACCAGCAGCTCCTACACCGGCGGGCCCCCTGCACCAGCCCCCTCCTGGCCCCCTG
TCATCTTCTGTCCCTTCCCAGAAAACCTACCAGGGCAGCTACGGTTTCCGTCTGGGCTTCTTGC
ATTCTGGGACAGCCAAGTCTGTGACTTGACGTA CTCCCCTGCCCTCAACAAGATGTTTTGCCA
ACTGGCCAAGACCTGCCCTGTGCAGCTGTGGGTTGATTCCACACCCCCGCCGGCACCCGCGTC
CGCGCCATGGCCATCTACAAGCAGTCACAGCACATGACGGAGGTTGTGAGGCGCTGCCCCCACC
ATGAGCGCTGCTCAGATAGCGATGGTCTGGCCCCCTCCTCAGCATCTTATCCGAGTGGAAGGAAA
TTTGCGTGTGGAGTATTTGGATGACAGAAACACTTTTCGACATAGTGTGGTGGTGCCCTATGAG
CCGCCTGAGGTTGGCTCTGACTGTACCACCATCCACTACA ACTACATGTGTAACAGTTCCTGCA
TGGGCGGCATGAACCGGAGGCCCATCCTCACCATCATCACACTGGAAGACTCCAGTGGTAATCT
ACTGGGACGGAACAGCTTTGAGGTGCGTGTTTGTGCCTGTCCTGGGAGAGACCGGCGCACAGAG
GAAGAGAATCTCCGCAAGAAAGGGGAGCCTCACCACGAGCTGCCCCCAGGGAGCACTAAGCGAG
CACTGCCCAACAACACCAGCTCCTCTCCCCAGCCAAAGAAGAAACCACTGGATGGAGAATATTT
CACCTTCAGATCCGTGGGCGTGAGCGCTTCGAGATGTTCCGAGAGCTGAATGAGGCCTTGAA
CTCAAGGATGCCAGGCTGGGAAGGAGCCAGGGGGGAGCAGGGCTCACTCCAGCCACCTGAAGT
CCAAAAAGGGTCAGTCTACCTCCCGCCATAAAAACTCATGTTCAAGACAGAAGGGCCTGACTC

AGACTGA₁₈₃₇CATTCTCCACTTCTTGTTCCTCCACTGACAGCCTCCCACCCCCATCTCTCCCTCCC
 CTGCCATTTTGGGTTTTGGGTCTTTGAACCCTTGCTTGCAATAGGTGTGCGTCAGAAGCACCCA
 GGACTTCCATTTGCTTTGTCCCAGGGCTCCACTGAACAAGTTGGCCTGCACTGGTGTGTTTGTG
 TGGGGAGGAGGATGGGGAGTAGGACATACCAGCTTAGATTTTAAGGTTTTTACTGTGAGGGATG
 TTTGGGAGATGTAAGAAATGTTCTTGCAAGTTAAGGGTTAGTTTACAATCAGCCACATTCTAGGT
 AGGGGCCACTTCACCGTACTAACCAGGGAAGCTGTCCCTCACTGTTGAATTTTCTCTAACTTCA
 AGGCCCATATCTGTGAAATGCTGGATTTGCCCTACCTCGGAATGCTGGCATTGTCACCTACCTC
 ACAGAGTGCATTGTGAGGGTT₂₂₉₇AATGAAATAATGTACATCTGGCCTTGAAACCACCTTTTATT
 ACATGGGGTCTAGCGGGATCCACTAGTAACGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCTGCAGATATCCAT
 CACACTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAG
 TTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCC
 ACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTC
 TGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGG
 GGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTCGAGGGGGATCCCC
 ACGCTAGAGCT₂₇₃₃GACTATAATAATAAAACGCCAACTTTGACCCGGAACGCGGAAAACACCTGA
 GAAAAACACCTGGGCGAGTCTCCACGTAAACGGTCAAAGTCCCCGCGGCCCTAGACAAATATTA

2848-腺病毒 5 基因组序列左侧

其中:

- 1) 腺病毒 5 基因组序列右侧和腺病毒 5 基因组序列左侧见腺病毒 5 基因组全序列 (Genbank No: NC_001406)
- 2) 1-70: 腺病毒右侧臂 (70 位碱基位于腺病毒 5 基因组序列正向 3328 位)
- 3) 71-523: Rous 肉瘤病毒的 LTR (启动子)
- 4) 524-655: 5' 端非翻译区
- 5) 656-1837: p53 基因的编码序列
- 6) 1838-2733: 3' 端非翻译区 (其中从 2298 开始为多聚腺苷酸尾 poly A)
- 7) 2734-2848: 腺病毒左侧臂 (2734 位碱基位于腺病毒 5 基因组序列正向 452 位碱基)

该基因重组药物的基因表达盒是由启动子—p53cDNA—多聚腺嘌呤核苷酸构成的特征序列，其上游为任一真核细胞启动子、原核细胞启动子或病毒启动子，下游为任何真核基因的多聚腺嘌呤核苷酸。

本发明的基因重组药物是通过如下方法获得的，重组病毒载体是在原核细胞中同源重组获得的，首先是腺病毒与质粒 pGT-1（含有腺病毒两侧反向重复序列）在大肠杆菌中同源重组获得基因重组药物 pGT-2，再与人工构建的“腺病毒右侧臂/启动子—p53cDNA—多聚腺嘌呤核苷酸/腺病毒左侧臂”在大肠杆菌中同源重组获得基因重组药物 pGT-3，随后经内切酶 *PacI* 线性化去除原核质粒序列，获得基因重组药物。

实质上，该基因重组药物可在任何原核细胞中以同源重组的方式获得。

根据上述方案，将 PCR 扩增腺病毒 5 两侧的 LTR 序列，分别引入 *PacI* 酶切位点。将两侧的 LTR 序列均克隆到 pUC18 载体中，构成重组载体 pGT-1；将构建的 pGT-1 载体与腺病毒 5 基因组共转染大肠杆菌株 BJ5183（赛百诺公司保存，保存号：P-e012），使腺病毒 5 基因组与 pGT-1 发生同源重组，阳性病毒克隆经扩增、PCR 筛选和酶切鉴定，获得含有腺病毒 5 全基因组的重组载体 pGT-2。

以 5' ATGGAGGAGCCGCGAGTCAGATC 和 5' ATATCTGCAGAATTCCAGCAC 作为引物，通过 PCR 扩增人类肿瘤抑制因子 p53 基因，将扩增的全长 p53 基因（含有 5' 和 3' 端非翻译区序列）克隆到原核质粒 pUC19，进行测序验证。随后，PCR 分别扩增 RSV（*roux sarcoma virus*）的 LTR 序列（含启动子）、BGH 的 PA 序列和腺病毒 E1 区序列，并于一侧分别引入 linker 序列，测序验证。再次进行 PCR 反应时，将 LTR 和 PA 序列分别拼接 to 紧靠 p53 基因的 5' 和 3' 端。将腺病毒 E1 区及其上游序列分别拼接 to p53 基因的最外侧，构成 p53 复合基因（见图 1）。

将构建好的重组载体 pGT-2 和 p53 复合基因共转染大肠杆菌株 BJ5183，使二者发生同源重组。同上，阳性克隆经扩增、PCR 筛选和酶切鉴定。获得重组载体 pGT-3，该载体中含有腺病毒 5 大部分序列（其 E1 区及上游部分序列被 p53 基因表达盒置换）。重组载体 pGT-3 经 *PacI* 酶切线性化，去除

来源于 pUC18 的载体序列, 转染 293 细胞(赛百诺公司冻存, 保存号: E-393) 培养。在细胞内包装成含有腺病毒顺式活化序列 (cis-acting sequence) 与 LTR 的启动子操纵的人肿瘤抑制基因 p53。组建成转染效率高、可操作性强、由单启动子控制的基因重组药物。

该基因重组药物具有下列特点:

它是由腺病毒载体和 p53 基因人工表达盒两部分构成,

1、结构特点: 其本质是一个活的重组腺病毒体, 不同于现有的化学合成药物、中药、基因工程药物, 是直接实现目的基因的体内表达, 生物学活性高, 可有效达到治疗作用; 腺病毒载体能携带较大的基因、转染率高、可制备高效价的病毒颗粒, 宿主范围广, 安全性好, 致病性低, 尤其是经改建后的腺病毒载体免疫原性大大下降, 使目的基因易于在机体内稳定、持久表达; p53 基因人工表达盒是用腺病毒载体单启动子直接调控 p53 基因的表达, 且有完整的多聚腺苷酸加尾信号, 从而构成一个完整的表达盒 (expression cassette), 可调控 p53 基因在靶细胞中高效表达。

2、应用特点: 该基因重组药物除具有对各种恶性肿瘤的治疗作用外, 对各种增生性疾病具有肯定的治疗作用, 它可诱导其异常增生细胞表达正常功能的 P53 蛋白, 从而有效抑制细胞的增殖, 达到治疗瘢痕疙瘩等增生性疾病的目的。

本发明将该基因重组药物先转染到基因工程改造过的特定细胞中培养、繁殖, 浓缩纯化成可用于临床的治疗增生性疾病的腺病毒载体与 p53 基因的基因重组药物注射液。

其中本发明实验所用的 293 细胞系 (ATCC CRL-1573, 第 32 代次, 1997 年 6 月 13 日从 ATCC 订购) 来源于经 5 型腺病毒 (Ad5) DNA 转化人胚胎肾上皮细胞获得, 含有 Ad5 5'端的 11%的基因组 (包括 E1a)。该细胞对腺病毒的感染和生长是高度许可的。

本发明的贡献在于, 它利用人类肿瘤抑制基因 p53 能抑制多种异常增生细胞生长的特点, 将其克隆到腺病毒 E1⁻株, 通过局部注射, 使腺病毒有效地将 p53 基因导入增生组织, 表达出 P53 蛋白后, 抑制异常增生细胞的

生长,使异常增生细胞出现生长阻滞或凋亡,从而达到抑制增生性疾病的目的。该发明同时也解决了由于 P53 蛋白半衰期短(约 20 分钟)、不稳定、无法体外制备成为重组基因工程产品的问题,即实现了 p53 基因的肿瘤和增生性疾病的治疗。

该基因重组药物利用腺病毒携带人类肿瘤抑制基因 p53,直接在异常增生细胞中表达,从而解决了由于 P53 蛋白不稳定、无法用基因工程的方法体外制备成重组基因工程产品的问题。用腺病毒进行增生性疾病治疗,病人可在体内持续、高效表达 P53 蛋白,并在蛋白质分子修饰程序上,如蛋白质磷酸化、蛋白质折叠以及多聚化等方面都具有与体内真核生物相同的特性。本发明的基因重组药物可直接介导 p53 基因在真核细胞中表达,也就是说可以直接导入增生局部让其表达,使受治疗者自身变成一个可生产人类肿瘤抑制因子 P53 蛋白的“源泉”。这种方法实现将外源 p53 基因的体内转移并在病人增生组织内高效表达而达到治疗目的,使得增生性疾病的基因治疗成为现实。

附图说明

图 1 是本发明的基因重组药物的构建过程示意图。

图 2 是本发明的基因重组药物的技术路线框图。

图 3 是基因重组药物经多次传代后,以 5'CCACGACGGTGACA CGCTTC 和 5' CAAGCAAGGGTTCAAAGAC 为引物,以 p53cDNA 为模版,通过 PCR 扩增得到的 p53 基因的琼脂糖凝胶电泳图,以鉴定其稳定性。

图 4 是基因重组药物(赛百诺公司冻存,保存号: No-1,下同)感染 293 细胞后 36 小时,经细胞裂解、提取病毒 DNA 经 PCR 鉴定的琼脂糖凝胶分析结果。

图 5 是基因重组药物感染 Hep-2 和 H1299 细胞后 36 小时,经细胞裂解、提取后经 Western blot 分析结果。

图 6 是体外原代培养的瘢痕成纤维细胞。

图 7 是用 S-P 染色及真空负压法进行成纤维细胞的鉴定。

图 8 是基因重组药物对瘢痕成纤维细胞的体外杀伤效应的光学照片。

图 9 是基因重组药物对瘢痕成纤维细胞的体外杀伤效应的电镜照片。

图 10 是该基因重组药物对临床瘢痕疙瘩病人治疗作用的术前、术后对比照片。

具体实施方式

下列实施例是对本发明的进一步解释和说明，对本发明不构成任何限制。

实施例 1

如图 1 和图 2 所示，构建基因重组药物及鉴定

1、已发表的 p53 基因 cDNA 全序列，设计合成两段引物：

5' ATGGAGGAGCCGCGAGTCAGATC 和 5' ATATCTGCAGAATTCCAGCAC 作为引物，两端分别引入 linker 序列。以 HeLa 细胞 cDNA 为模板，经 PCR 方法扩增得到人 p53 基因，其中，反应条件为：第一循环：94℃变性 4 分钟，58℃退火 1 分钟，72℃延伸 2 分钟；以后各循环：94℃变性 1 分钟，58℃退火 1 分钟，72℃延伸 2 分钟，共 30 个循环。由此得到大量的 p53 基因，用琼脂糖凝胶电泳分析，回收得到 p53 基因全长，片段纯化后再用此酶切割 p53 基因，插入到同样酶切的 pUC19 载体中测序，测得编码区的碱基序列和推导的氨基酸序列（与 GenBank Acc XM_058834 一致），随后酶切回收。

2、PCR 反应扩增 LTR 和 PA 序列，引物分别为：

5'TCTGACATGCGATGTCGACTCG，5' CGGCAGTGACCCGGAAAGCAG；5' TCACAGAGTGCA TTGTGAGGG，5' GCTCTAGCGTGGGGATCCC。分别于 5'引物和 3'端引物引入 linker 序列。同上的退火条件下，PCR 扩增 LTR 和 PA 序列，纯化后克隆测序验证。

3、PCR 反应分开扩增腺病毒的 E1 序列，反应条件同上，两端引物分别引入 Bam HI 和 Eco RI 酶切位点，扩增后测序验证。

4、将 1 所得序列分别与 2 所得的两条序列进行 PCR 反应，反应条件同前，得到 PCR 拼接产物 LTR-p53-PA，进一步测序验证。

5、将 3 所得序列与 4 所得序列 LTR-p53-PA 经 T4 DNA 粘接酶粘接，获

得 p53 复合基因。

6、PCR 反应分别扩增腺病毒两端 IRT 序列，反应条件同上，测序验证后分别将两段序列克隆到 pUC18 载体中构成重组载体 pGT-1。

7、提取野生型腺病毒 5 (ATCC-VR-5, 腺病毒株 75, 滴度: $10(6.75)$ TCID₅₀ /ml) DNA, 与重组载体 pGT-1 共转染大肠杆菌 BJ5183, 经 4℃ 孵育 30 分钟, 42℃ 热休克 50 秒钟, 再在 4℃ 孵育 1 分钟, 加 1ml LB 培养液 1 小时, 将温育的工程菌转入含安卡青霉素的琼脂培养板, 24 小时后, 用灭菌牙签挑取单个细菌克隆, 然后放入干净的含有 LB 的培养瓶中, 24 小时后, 按常规方法提取质粒, 用 *PacI* 切割筛选, 获得阳性克隆为 pGT-2 (含有 Ad5 全序列)。

8、将 p53 复合基因与重组载体 pGT-2 共转染大肠杆菌 BJ5183, 同上方法培养, 筛选和鉴定, 获得阳性克隆 pGT-3, 含有腺病毒全基因组序列及插入的 p53 基因表达盒, 再用 *PacI* 酶切, 使之线性化, 去除来源于 pUC18 的载体序列。

9、将分离的阳性质粒线性化后经 CsCl₂ 纯化, 经 CaCl₂ 方法转染 293 细胞。7 天后, 收集细胞, 1000rpm 离心 15 分钟, 弃上清, 细胞经 37℃-80℃ 冻融, 裂解三次, 4000rpm 离心 30 分钟, 取上清, 弃沉淀, 上清经二次感染, 扩增病毒, 以同样方法裂解病毒, 上清经 CsCl₂ 密度梯度离心, 条件为: 4℃ 60000 rpm, 16 小时。经 7 号注射针头取重组腺病毒体分离带。用 Spectra MW6000 透析袋在 N1H 缓冲液中透析 4 小时, 整个过程保持 4℃。取出病毒液, 用 0.25 μm 的滤膜过滤除菌, 分装。于 -80℃ 保存, 一部分作空斑形成试验及病毒颗粒含量测定。

10、基因重组药物的结构稳定性鉴定, 经多次传代后, 提取其基因组 DNA, 以 p53 基因两端 5'CCACGACGGTGACACGCTTC 和 5' CAAGCAAGGGT TCAAAGAC 为引物, 进行 PCR 扩增, 琼脂糖凝胶电泳结果见图 3; 以基因重组药物表达装置两侧的腺病毒臂 5' TTT CTC AGG TGT TTT CCG C 和 5' CAT CGT ACC TCA GCA CCT TC 为引物, PCR 鉴定结果见图 4。以上结果均表明基因重组药物经多次传代后结构稳定。

11、基因重组药物介导的 p53 基因在 Hep-2 和 H1299 细胞的表达鉴定。用重组 p53 腺病毒体感染 293 细胞 36 小时后，常规方法裂解细胞，以 P53 蛋白特异性抗体进行 western blot 分析，结果见图 5。

实施例 2

基因重组药物对体外原代培养的成纤维细胞杀伤作用：

瘢痕成纤维细胞的体外培养（见图 6）：将手术切除下的瘢痕皮肤，在无菌条件下剪成 $0.5-1\text{cm}^3$ 小块，立即投入含 1000U/ml 青、链霉素的培养液中。先将组织用 PBS（含青霉素、链霉素）洗 2 次，去除脂肪及结缔组织，再用 D-Hank 液洗数次，至液体无油滴，不混浊，反复剪碎至 1mm^3 的小块，加数滴血清于组织块上，然后将皮肤小块按适当间隔放置于培养瓶壁上，翻转培养瓶，使有组织块一面向上，加入含 10%FBS 的 DMEM 培养液（注意：勿使组织与培养液接触！），将有组织块的一面向上，入 37°C ，5%CO₂ 培养箱中静置培养，6-8hr 后，轻轻翻转培养瓶，3-4 天内勿动，以后每 3-4 天换液一次，10 天左右组织块周围长出细胞，并渐渐形成细胞晕，一个月左右细胞长满瓶，形成单层细胞。

采用 S-P 染色及真空负压法进行细胞类型鉴定

样品制备：用胰酶消化细胞后，制成 10000 个/ml 的细胞悬液，将 $18 \times 18\text{mm}$ 的盖玻片放进 55mm 培养皿中，每张盖片上滴加两滴细胞悬液，置 CO₂ 培养箱中孵育 6-8h，依次夹出盖玻片，PBS 彻底清洗 3 次，置纯丙酮中，室温下固定 15min 后，PBS 清洗 3 次。

用真空负压法进行 S-P 法免疫细胞化学染色（见图 7）：使盖玻片细胞面向上，置载玻片上，每张滴加 $50\mu\text{l}$ （鼠抗人），阴性对照组加入等量的 PBS。置真空负压箱中，抽负压至 66.7KPa，10min 后取出，PBS 洗 3 次，各加 $50\mu\text{l}$ 生物素标记的第二抗体，置真空负压箱 10min 后取出，PBS 洗 3 次；各加 $50\mu\text{l}$ 链霉素亲生物素蛋白-过氧化物酶溶液，置负压箱 10min 后取出 PBS 洗 3 次；各加 $10\mu\text{l}$ DAB 溶液显色，室温下 10min 后，PBS 洗 3 次，苏木素复染 1min，1%酒精蓝化数秒，系列酒精脱水，二甲苯透明，中性树胶封片，显微镜下观察。

光镜下细胞形态变化的观察(见图8): 在 25cm^2 培养瓶中接种约 5×10^5 瘢痕成纤维细胞, 培养 24h 后, 换液, 加基因重组药物按 200MOI 进行感染, 24h, 48h, 72h 后在光镜下观察细胞形态变化。

电镜下细胞结构的变化(见图9): 在 25cm^2 培养瓶中接种约 5×10^5 瘢痕成纤维细胞, 培养 24h 后, 换液, 加基因重组药物按 200MOI 进行感染, 培养 48h。用胰酶消化、收集细胞悬液于事先制备好的琼脂管中, 2000r/min 离心 15min, 使细胞成团。用 2% 戊二醛及 1% 四氧化锇双重固定细胞。将琼脂包埋的细胞团块经脱水、环氧树脂渗透与包埋、超薄切片及染色后, 在透射电镜下观察和照像。

实施例 3

该基因重组药物在基因治疗瘢痕临床研究中对瘢痕疙瘩的治疗作用。

如图 10A、图 10B 所示, 女性瘢痕疙瘩患者, 左侧前胸曾因暗疮后瘢痕而手术, 切除后复发瘤样瘢痕, 术后局部复发 3 年, 经激素等常规治疗无效, 前胸瘢痕体积 $2 \times 1 \times 1\text{cm}^3$ (见图 10A)。经基因治疗 4 周后, 前胸部瘢痕明显萎缩, 体积明显缩小, 局部组织发暗(见图 10B); 除自限性发热外, 未见其它明显的毒副作用。临床试验研究结果表明, 基因重组药物治疗瘢痕疙瘩是安全有效的。

权 利 要 求

1、一种治疗增生性疾病的腺病毒载体与 p53 基因的基因重组药物，其特征在于，该基因重组药物是由腺病毒载体与 p53 人肿瘤抑制基因表达盒构建而成，其融合序列为：

腺病毒 5 基因组序列右侧-ATGTTTACCGCCACACTCGCAGGGTCTGCACCTGGTGCGGG
TTCATCGTACCTCAGCACCTTCCAGATC₇₀TCTGACATGCGATGTCGACTCGACTGCTTCGCGA
TGACGGGCCAGATATACCGGTATCTGAGGGGACTAGGGTGTGTTTAGGCGAAAAGCGGGGCTT
CGGTTGTACGCGTTAGGAGTCCCCTCAGGATATAGTAGTTTCGCTTTTGCATAGGGAGGGGGA
AATGTAGTCTTATGCAATACTCTTGTAGTCTTGCAACATGGTAACGATGAGTTAGCAACATGCC
TTACAAGGAGAGAAAAAGCACCGTGCGATGCCGATTGGTGGAAGTAAGGTGGTACGATCGTGCCT
TATTAGGAAGGCAACAGACGGGTCTGACATGGATTGGACGAACCACTGAATTCCGCATTGCAGA
GATATTGTATTTAAGTGCCTAGCTCGATACAATAAACGCCATTTGACCATTACCCACATTGGTG
TGCACCTCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCCG₅₂₃CTAGAGCCACCGTCCAGGGAGCAGGTAG
CTGCTGGGCTCCGGGGACACTTTGCGTTCCGGGCTGGGAGCGTCTTTCCACGACGGTGACACGCT
TCCCTGGATTGGCAGCCAGACTGCTTTCCGGGTCACTGCC₆₅₅ATGGAGGAGCCGCAGTCAGATCC
TAGCGTCGAGCCCCCTCTGAGTCAGGAAACATTTTCAGACCTATGGAACTACTTCCTGAAAAC
AACGTTCTGTCCCCCTTGCCGTCCCAAGCAATGGATGATTTGATGCTGTCCCCGGACGATATTG
AACAATGGTTCACTGAAGACCCAGGTCCAGATGAAGCTCCCAGAATGCCAGAGGCTGCTCCCC
CGTGGCCCCCTGCACCAGCAGCTCCTACACCGGCGGCCCTGCACCAGCCCCCTCCTGGCCCCCTG
TCATCTTCTGTCCCTTCCCAGAAAACCTACCAGGGCAGCTACGGTTTCCGTCTGGGCTTCTTGC
ATTCTGGGACAGCCAAGTCTGTGACTTGCACGTACTCCCCTGCCCTCAACAAGATGTTTTGCCA
ACTGGCCAAGACCTGCCCTGTGCAGCTGTGGGTTGATTCCACACCCCCGCCGGCACCCGCGTC
CGGCCATGGCCATCTACAAGCAGTCACAGCACATGACGGAGGTTGTGAGGCGCTGCCCCACC
ATGAGCGCTGCTCAGATAGCGATGGTCTGGCCCCCTCCTCAGCATCTTATCCGAGTGGAAGGAAA
TTTGCGTGTGGAGTATTTGGATGACAGAAACACTTTTCGACATAGTGTGGTGGTGCCCTATGAG
CCGCCTGAGGTTGGCTCTGACTGTACCACCATCCACTACAACATACATGTGTAACAGTTCCTGCA
TGGGCGGCATGAACCGGAGGCCCATCCTCACCATCATCACACTGGAAGACTCCAGTGCGTAATCT

ACTGGGACGGAACAGCTTTGAGGTGCGTGTTTGTGCCTGTCCTGGGAGAGACCGGCGCACAGAG
 GAAGAGAATCTCCGCAAGAAAGGGGAGCCTCACCACGAGCTGCCCCAGGGAGCACTAAGCGAG
 CACTGCCCAACAACACCAGCTCCTCTCCCCAGCCAAAGAAGAAACCACTGGATGGAGAATATTT
 CACCCTTCAGATCCGTGGGCGTGAGCGCTTCGAGATGTTCCGAGAGCTGAATGAGGCCTTGGA
 CTCAAGGATGCCAGGCTGGGAAGGAGCCAGGGGGGAGCAGGGCTCACTCCAGCCACCTGAAGT
 CCAAAAAGGGTCAGTCTACCTCCCGCCATAAAAACTCATGTTCAAGACAGAAGGGCCTGACTC
 AGACTGA₁₈₃₇CATTCTCCACTTCTTGTTCCCCACTGACAGCCTCCCACCCCCATCTCTCCCTCCC
 CTGCCATTTTGGGTTTTGGGTCTTTGAACCTTGCTTGCAATAGGTGTGCGTCAGAAGCACCCA
 GGACTTCCATTTGCTTTGTCCCGGGGCTCCACTGAACAAGTTGGCCTGCACTGGTGTTTTGTTG
 TGGGGAGGAGGATGGGGAGTAGGACATAACCAGCTTAGATTTTAAGGTTTTTACTGTGAGGGATG
 TTTGGGAGATGTAAGAAATGTTCTTGCAGTTAAGGGTTAGTTTACAATCAGCCACATTCTAGGT
 AGGGGCCACTTCACCGTACTAACCAGGGAAGCTGTCCCTCACTGTTGAATTTTCTCTAACTTCA
 AGGCCCATATCTGTGAAATGCTGGATTTGCCCTACCTCGGAATGCTGGCATTGTCACCTACCTC
 ACAGAGTGCATTGTGAGGGTT₂₂₉₇AATGAAATAATGTACATCTGGCCTTGAAACCACCTTTTATT
 ACATGGGGTCTAGCGGGATCCACTAGTAACGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCTGCAGATATCCAT
 CACACTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAG
 TTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCC
 ACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATT
 TGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGG
 GGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTCGAGGGGGATCCCC
 ACGCTAGAGCT₂₇₃₃GACTATAATAATAAACGCCAACTTTGACCCGGAACGCGGAAAACACCTGA
 GAAAAACACCTGGGCGAGTCTCCACGTAAACGGTCAAAGTCCCCGCGGCCCTAGACAAATATTA
₂₈₄₈-腺病毒 5 基因组序列左侧

其中：

- 8) 腺病毒 5 基因组序列右侧和腺病毒 5 基因组序列左侧见腺病毒 5 基因组全序列 (Genbank No: NC_001406)
- 9) 1-70：腺病毒右侧臂 (70 位碱基位于腺病毒 5 基因组序列正向 3328 位)

- 10) 71-523: Rous 肉瘤病毒的 LTR (启动子)
- 11) 524-655: 5' 端非翻译区
- 12) 656-1837: p53 基因的编码序列
- 13) 1838-2733: 3' 端非翻译区 (其中从 2298 开始为多聚腺苷酸尾 poly A)
- 14) 2734-2848: 腺病毒左侧臂 (2734 位碱基位于腺病毒 5 基因组序列正向 452 位碱基)

2、如权利要求 1 所述的基因重组药物, 其特征在于, 该基因重组药物的基因表达盒是由启动子—p53cDNA—多聚腺嘌呤核苷酸构成的特征序列。

3、如权利要求 2 所述的基因重组药物, 其特征在于, 所述基因表达盒的上游为任一真核细胞启动子、原核细胞启动子或病毒启动子, 下游为任何真核基因的多聚腺嘌呤核苷酸。

4、如权利要求 1 所述的基因重组药物, 其特征在于, 该基因重组药物是在原核细胞中同源重组获得的, 首先是腺病毒与质粒 pGT-1 (含有腺病毒两侧反向重复序列) 在大肠杆菌中同源重组获得基因重组药物 pGT-2, 再与人工构建的“腺病毒右侧臂/启动子—p53cDNA—多聚腺嘌呤核苷酸/腺病毒左侧臂” 在大肠杆菌中同源重组获得基因重组药物 pGT-3, 随后经内切酶 *PacI* 线性化去除原核质粒序列, 获得基因重组药物。

5、如权利要求 4 所述的基因重组药物, 其特征在于, 该基因重组药物在任何原核细胞中以同源重组的方式获得。

6、如权利要求 1 所述的基因重组药物可制成注射液。

7、如权利要求 6 所述的基因重组药物可制成注射用针剂。

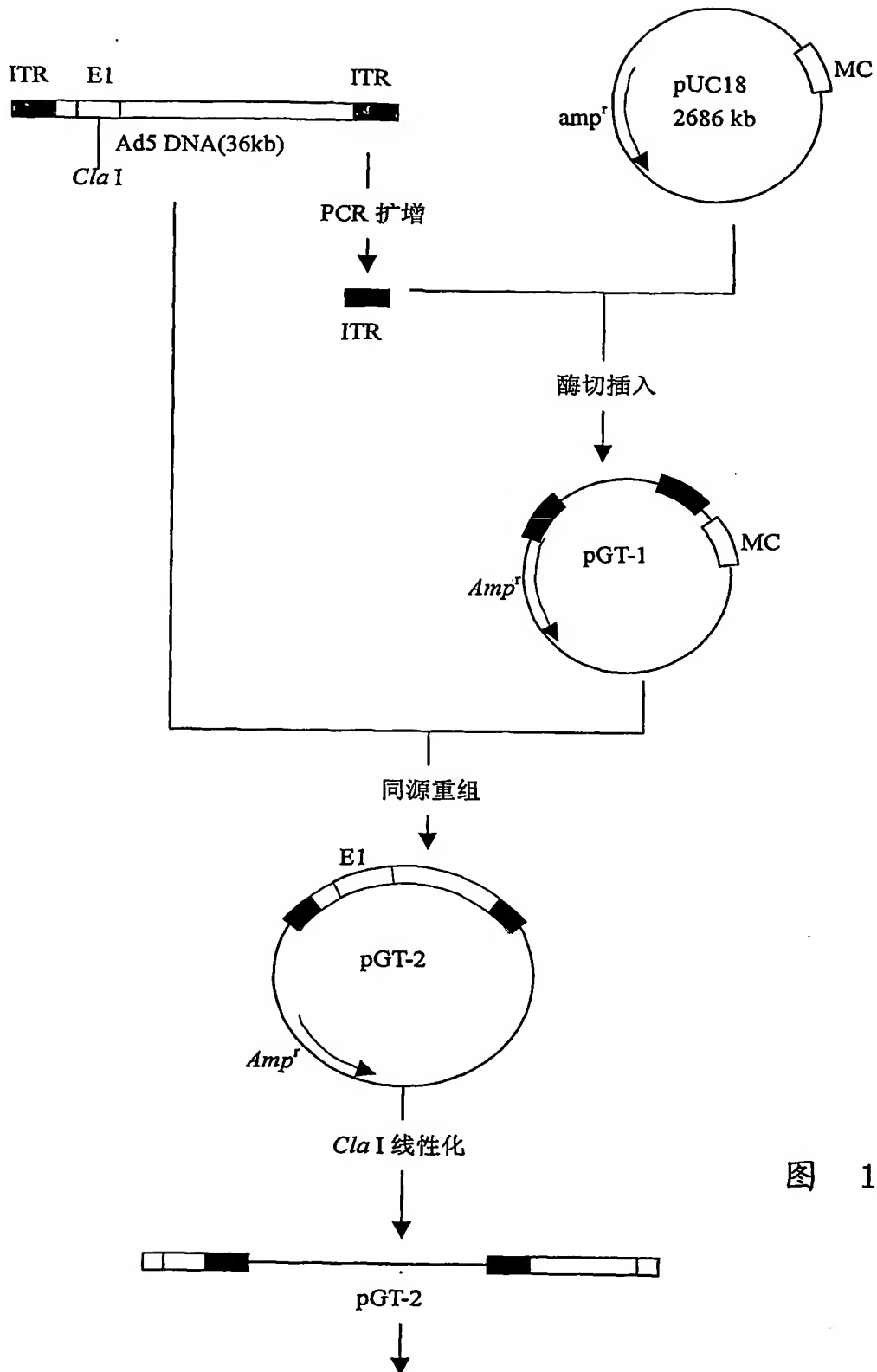


图 1A

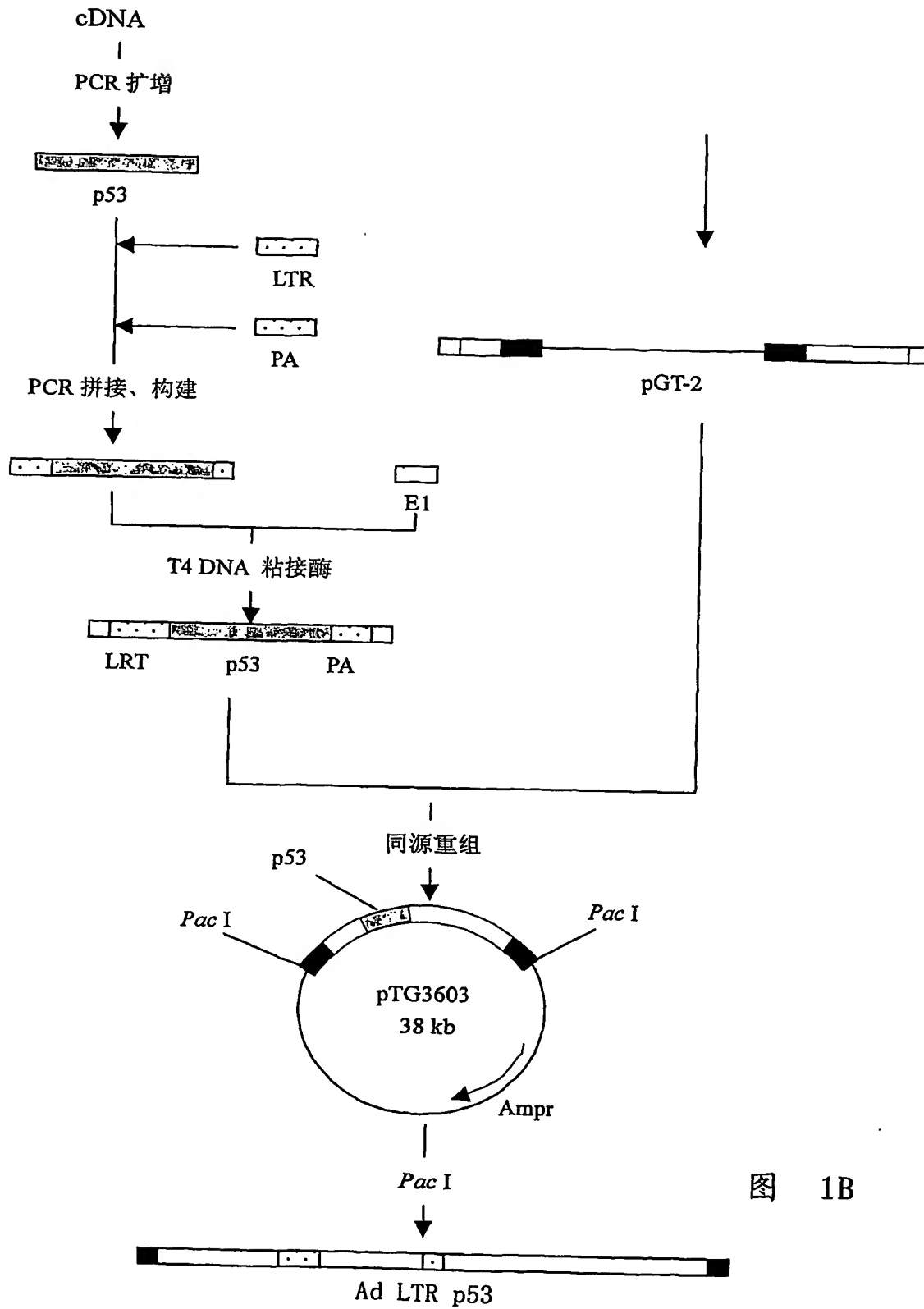


图 1B

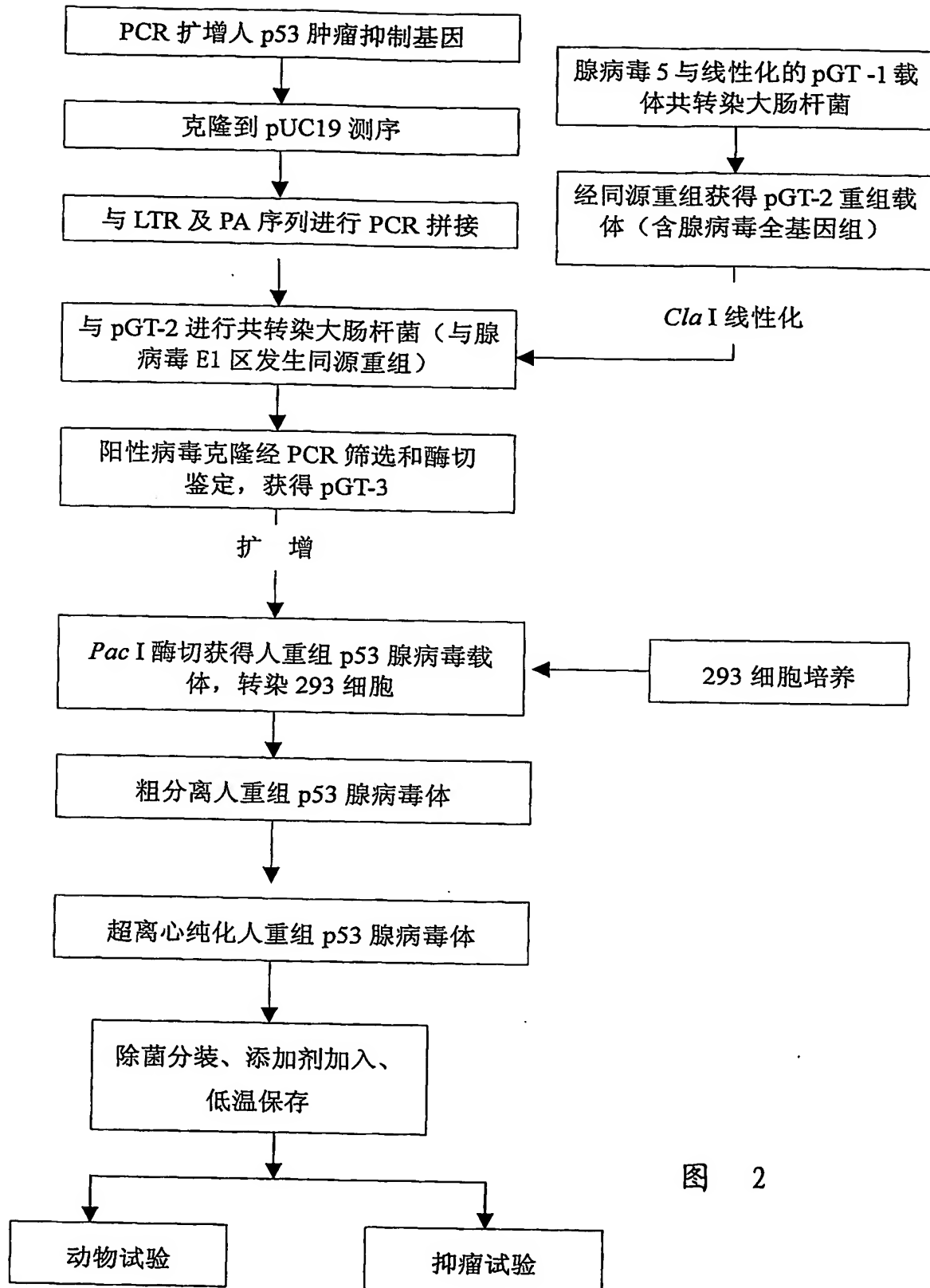


图 2

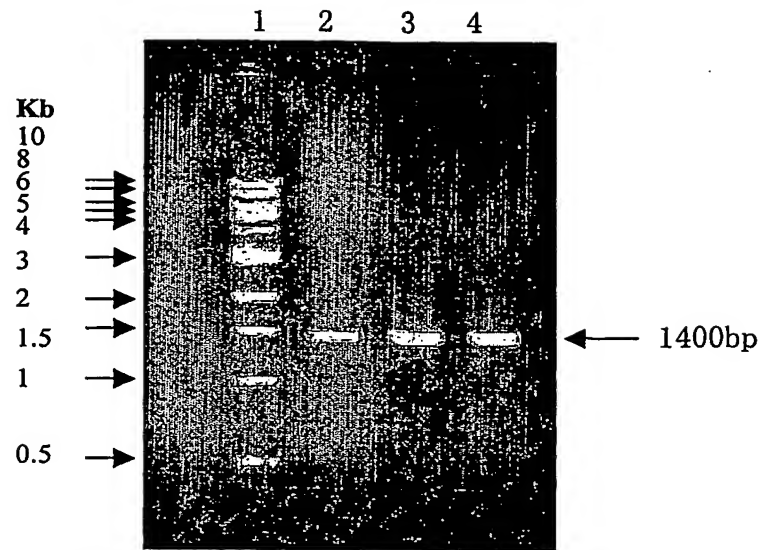


Fig. 3 PCR 扩增 p53 基因得到的 1400bp 的 p53 基因的电泳图。
1, DNA 分子量 markers; 2、3、4, p53 cDNA 的 PCR 结果。

图 3

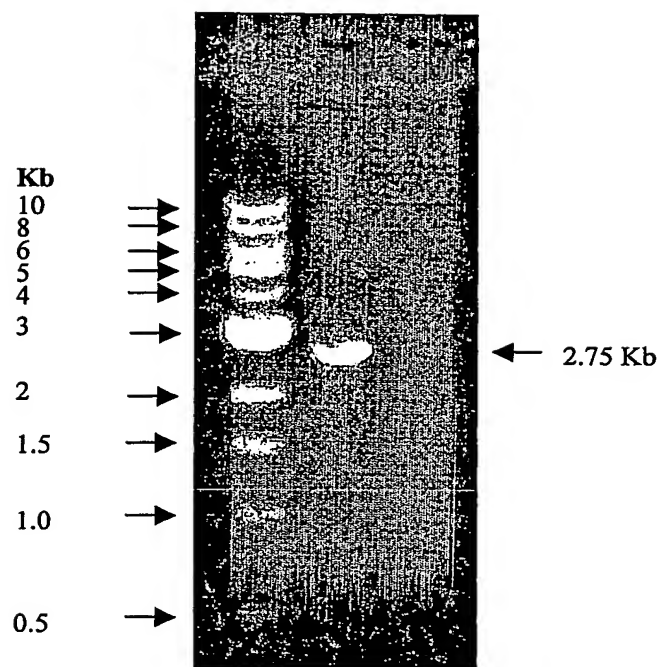


Fig. 4 PCR 扩增重组 p53 腺病毒体的表达装置, 得到的约 2750 bp 的 p53 基因的电泳图。1, DNA 分子量 markers; 2, 表达装置的 PCR 结果。

图 4

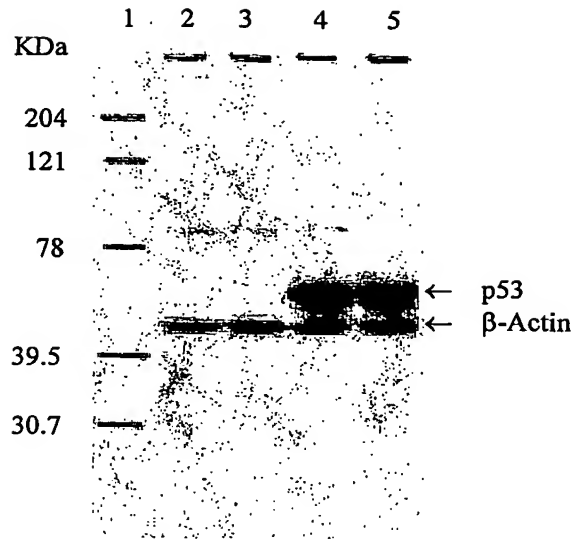


Fig5. 重组 p53 腺病毒体介导的 p53 基因在 Hep-2 和 H1299 细胞的表达。 1. 蛋白质标准分子量; 2-3. 阴性对照: 分别为未经 SBN-1 感染的 Hep-2 和 H1299 细胞; 4-5: 分别为 SBN-1 感染的 Hep-2 和 H1299 细胞。

图 5

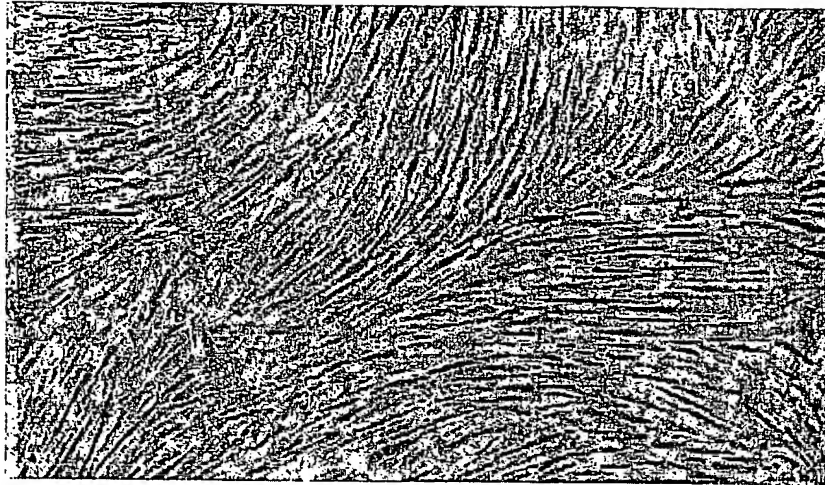


Fig.6 可见传代成纤维细胞排列较整齐，呈结节状或漩涡状走行。光镜下成纤维细胞呈梭形或不规则形，细胞界线清楚。

图 6

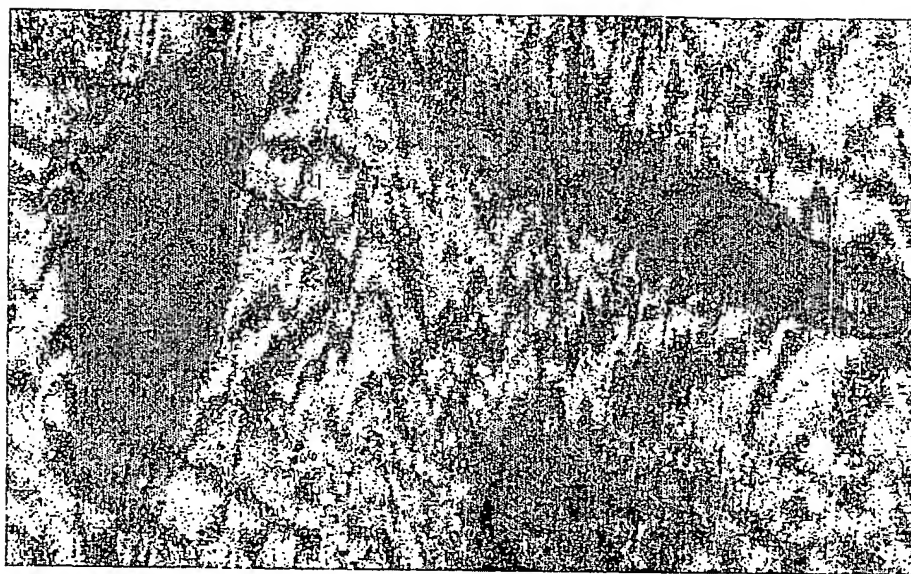


Fig.7 用 S-P 染色及真空负压法显示扁平的梭形细胞的胞浆呈棕色，胞核被复染成兰色，传代细胞全部为阳性细胞，说明它们能够生成 III 型原胶原蛋白，培养的细胞确实为成纤维细胞。

图 7

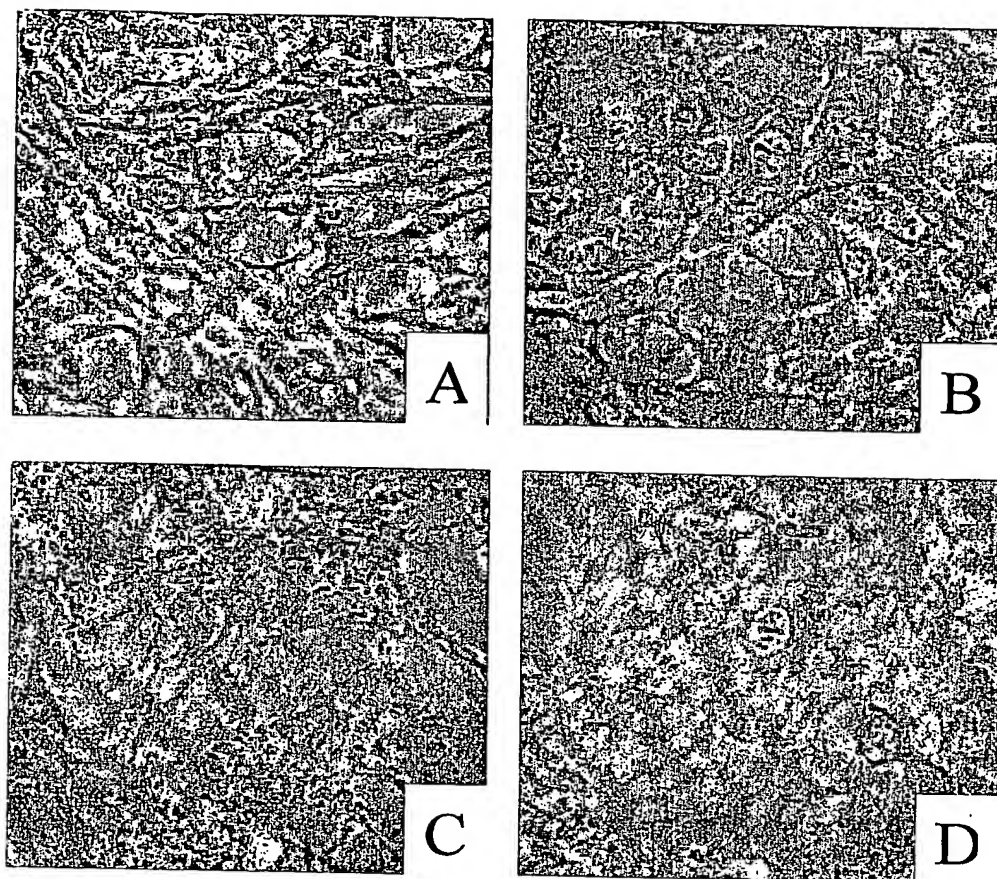


Fig.8 B、C、D 依次记录了瘢痕成纤维细胞经基因重组药物 (MOI=200) 感染后 24h、48h 和 72h 的细胞形态。可见细胞逐渐出现体积明显变大, 形态由梭形变成圆形或多边形; 胞浆增多; 核分裂象减少, 核离散、崩解等变化, 而对照组 A 中细胞形态无明显变化

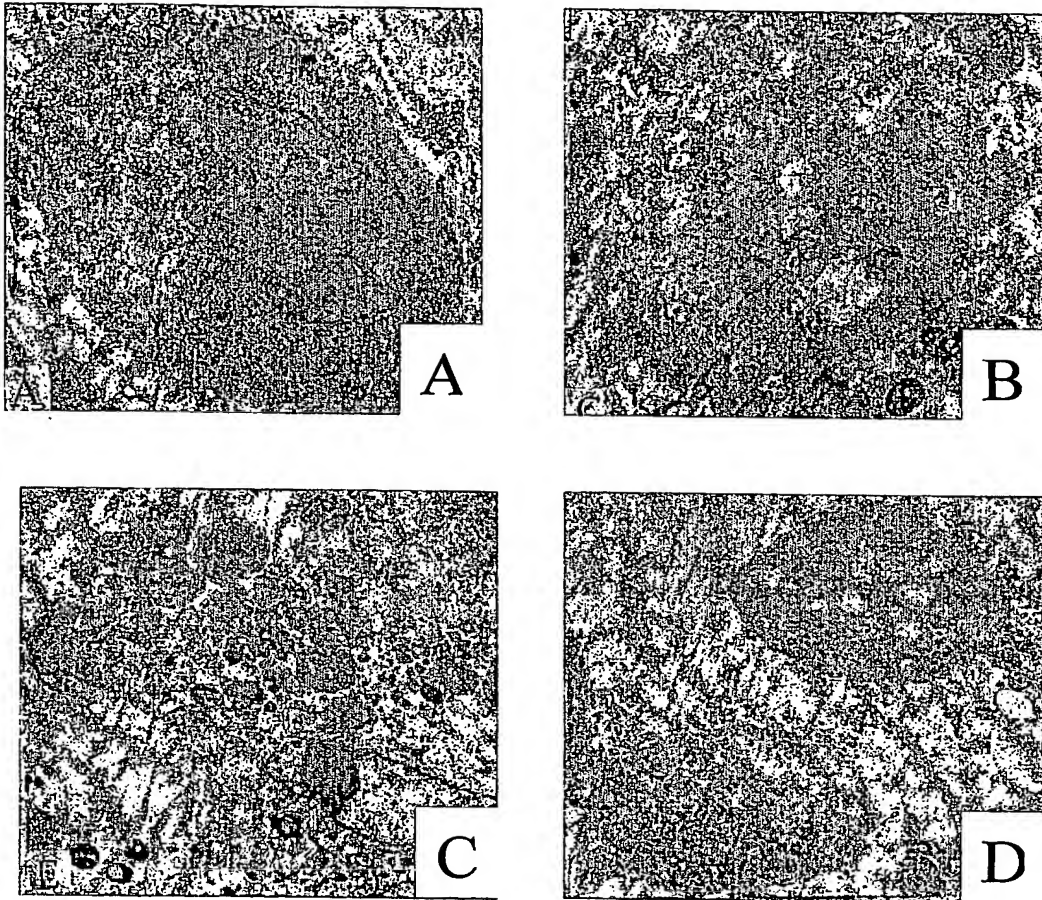


Fig.9 用透射电镜观察结果显示，经基因重组药物（MOI=200）条件下，Fig.9A,B,C 直观描述了细胞从“起泡”到产生凋亡小体并脱落的过程；Fig.9 D 可见凋亡细胞的另一种现象，细胞内线粒体明显增多。

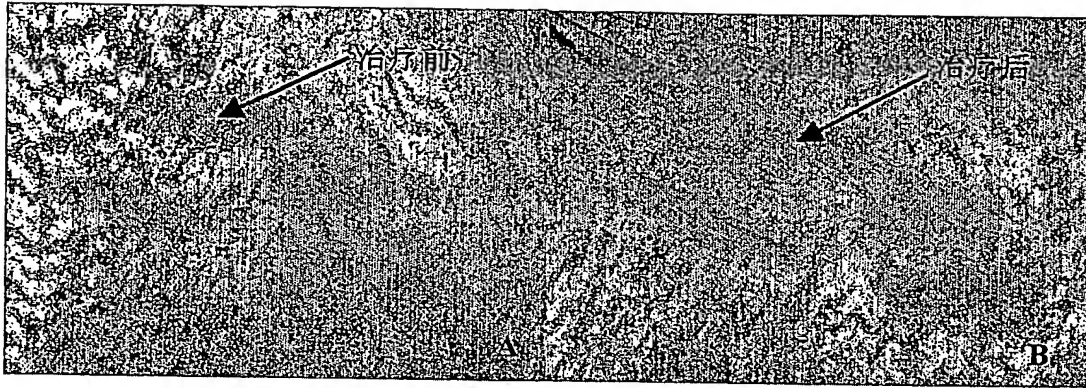


Fig.10 经基因重组药物治疗 4 周后，前胸部瘢痕明显萎缩，体积明显缩小，局部组织发暗。

图 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2004/000458

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC7:C12N15/86,C12N15/12,A61K48/00,A61P17/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC7:C12N,A61K,A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CPRS,WPI,EPODOC,PAJ,BA,GENEBANK: P53, 腺病毒,adenovirus,keloid,proliferation,proliferative

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN, A, 1401778 (PENG , Zhaohui et al) 12, MAR, 2003 (12, 03, 2003) (CLAIM 6-10,13)	1-7
A	Journal-of-Dermatological-Science; 22 (1): 31-37 , Dec., 1999 Teofoli,p et al.:Expression of Bcl-2,p53,c-jun and c-fos protooncogenes in Keloids and hypertrophic scars.	1-7

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
30.06.2004

Date of mailing of the international search report

05 · AUG 2004 (05 · 08 · 2004)

Name and mailing address of the ISA/

The Patent Office, State Intellectual Property Office Of The
People's Republic of China
6 Xitucheng Road Haidian District, Beijing, 100088, P.R.China

Authorized officer

Telephone No. (86-10)62085090

Facsimile No. (86-10)62019451



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2004/000458

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item item1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
- a. type of material
 - ☒ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material
 - ☒ in written format
 - ☒ in computer readable form
 - c. time of filing/furnishing
 - ☐ contained in the international application as filed
 - ☐ filed together with the international application in computer readable form
 - ☒ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2004/000458

A. 主题的分类

IPC7: C12N15/86, C12N15/12, A61K48/00, A61P17/00

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC7: C12N, A61K, A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CPRS, WPI, EPODOC, PAJ, BA, GENE BANK: P53, 腺病毒, adenovirus, keloid, proliferation, proliferative

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	CN, A, 1401778 (彭朝晖等) 12, 3 月, 2003 (12, 03, 2003) (权利要求 6-10, 13)	1-7
A	Journal-of-Dermatological-Science. 22 (1): 31-37, Dec., 1999; Teofoli, p et al.: Expression of Bcl-2, p53, c-jun and c-fos protooncogenes in Keloids and hypertrophic scars.	1-7

☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。

☐ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 为确定另一篇
引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引
用的文件

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了
理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的
发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件
结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时,
要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

30.06.2004

国际检索报告邮寄日期

05 · 8月 2004 (05 · 08 · 2004)

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088

传真号: (86-10)62019451

受权官员



电话号码: (86-10)62085090

第I栏 核苷酸和/或氨基酸序列表(接第1页第1(b)项)

1、关于国际申请中所公开的是对要求保护的发明所必要的核苷酸和/或氨基酸序列表, 国际检索是在下列基础上进行的:

a. 材料的类型

☒ 序列表

☐ 与序列表相关的表格

b. 材料的形式

☒ 书面形式

☒ 计算机可读形式

c. 提交/提供时间

☐ 包括于已提交的国际申请。

☐ 以计算机可读形式与国际申请一起提交。

☒ 为检索之用随后提交本国际检索单位。

2、☐ 另外, 在提交/提供了多个序列表和/或与其相关的表格的版本或副本的情况下, 提供了关于后提交的或附加的副本与已提交之国际申请中的序列表相同或未超出国际申请中序列表范围(如适用)的声明。

3. 补充意见